



EESTI VABARIIK

RIIGI PATENDIAMET  
The Estonian Patent Office



RECEIVED  
SEP 17 2001  
TECH CENTER 1600/2900

# TÕEND Certificate

Taotluse nr  
Application No

199900072

Käesolevaga tõendatakse, et lisatud ära kiri on Riigi Patendiametile esitatud taotluse algdokumentide tõene ära kiri.

This is to certify that the copy annexed hereto is a true copy from the documents of application as originally filed with the Estonian Patent Office.



Tallinn 23 -03- 2001

Osakonnajuhataja  
Head of Department

Patendiamet tõendab, et  
The Estonian Patent Office certifies that

Asper OÜ

esitas patenditaotluse nr  
filed a patent application No

P199900072

leiutisele  
entitled

Meetod ja seade biopolümeermaatriksi lugemiseks ja analüüsiks

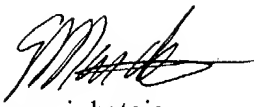
Patendiametile  
with the Estonian Patent Office on

21.04.1999

Rahvusvahelise patendiklassifikatsiooni indeks  
International Class

G01N 21/64

Tallinn, 23.03.2001

Elle Mardo   
Patendiosakonna juhataja  
Head of Patent Department

## Meetod ja seade biopolümeermaatriksi lugemiseks ja analüüsiks

### TEHNIKAVALDKOND

- 5 Käesolev leiutis kuulub molekulaarbioloogia, molekulaardiagnostika ja laseroptika valdkonda. Täpsemalt käsitleb leiutis meetodit fluorestsentsmarkeritega märgistatud biopolümeerimolekulide paralleelseks detekteerimiseks ja analüüsiks kahemõõtmelisel maatriksil, kasutades täielikku sisepeegeldusfluorestsentsi ning fluorestsentsdetektorit selle meetodi kasutamiseks.

10

### TEHNIKA TASE

- Eelnevalt valmistatud lühikeste biopolümeeride (nukleiinhapete, peptiidide vm) keemilisel sidumisel tahkele läbipaistvale alusele (klaasile) kahemõõtmelise struktuurina on võimalik  
15 taolist maatriksstruktuuri kasutada diagnostilistel eesmärkidel, näiteks liites (hübridiseerides) maatriksina seotud DNA ahelatele uuritava nukleiinhappe lõigu. Uuritav materjal võib olla eelnevalt fluorofooridega märgistatud, märgise lülitumine võib aga toimuda ka vahetult enne analüüsi. Nukleiinhappemaatriksi lugemiseks ja analüüsiks kasutatakse mitmesuguseid erinevatel füüsikalistel printsiipidel põhinevaid aparate, milliseid on võimalik jagada  
20 põhiliselt kahte kategooriasse, esiteks detektorid ja teiseks konfokaalmikroskoopiaal põhinevad skannerid.

- Käesolevas leiutises esitatud seadme, täielikul sisepeegeldusfluorestsentsil põhineva fluorestsentsdetektori lähim lahendus on firma "Vysis Inc., " (Downers Grove, IL, USA) poolt  
25 valmistatud CCD kaameral põhinev instrument "GenoSensor™".

- CCD kaameral põhinev instrument "GenoSensor™" töötab järgmiselt. Klaasalusele seotud DNA proovidega hübridiseerunud fluorestsentsmärgisega analüüsitavate molekulide detekteerimiseks ergastatakse DNA maatriksit läbivas valguses (joonis fig. 1)  
30 ksenoonlambiga, filtrides vastava filtriga koguvalgusest välja fluorofooride ergastamiseks vajamineva spektrijoone. Fluorofooride poolt emiteeritud valgus filtreeritakse vastava emissioon filtriga ja kogutakse optika abil kõrglahutusega jahutatava CCD kaamera poolt, mille järel saadud signaalid töödeldakse arvutis.

Nukleiinhappe maatriksi puhul on tegemist tahkele läbipaistvale alusele seotud suure tihedusega nukleiinhappemolekulide kahemõõtmelise (2D) struktuuriga. Maatriksil tehtud bioloogilise reaktsiooni tulemuse hindamisel on probleemiks detekteerimise nii madal tundlikkus ja selektiivsus (läbiva valguse kasutamine fluorokroomide ergastamiseks on ebaefektiivne, koguvalgusest tuleb välja filtreerida vastava fluorofoori ergastamiseks vajaminev spektrijoon), kui ka detekteerimise kiirus (skaneerimine on reeglina aeganõudev). Kuna oligonukleotiidmaatriksil põhineva polümeraasi ekstensiooni (APEX, Arrayed Primer Extension) puhul kasutatakse nelja erineva fluorofooriga märgitud dideoksünukleotiidi (terminaatorit) reaktsioonis üheaegselt, siis on vajalik taolise nukleiinhappemaatriksi lugemiseks neljas spektrialas töötavat detektorit. Antud detektor peab võimaldama iga fluorofoori maksimaalselt efektiivse ergastamise ja signaalide jäädvustamise, millest on võimalik hiljem kokku panna terviklik analüüsi tulemus.

#### LEIUTISE OLEMUS

Ülaltoodud probleemide lahendamiseks pakutakse käesolevas leiutises meetodit, milles kasutatakse täielikku sisepeegeldusfluorestsentsi (joonis fig. 2) biopolümeermaatriksi lugemiseks (näiteks nukleotiidide järjestuse määramiseks uuritavas DNA molekulis) ja sisepeegeldusfluorestsentsi kasutamisel põhinevat detektorit kui seadet, mis tagab nukleiinhappemaatriksil tehtud reaktsioonide tulemuse kiire ja täpse hindamise kuni neljas erinevas valgusspektri alas.

Käesoleva leiutise eesmärk on pakkuda seade ja meetod biopolümeermaatriksil ehk *chipil* tehtud bioloogilise reaktsiooni tulemuse analüüsiks. Näiteks nukleiinhappemaatriksit saab kasutada põhiliselt kahel viisil. Esimesel juhul, ainult hübridisatsioonil põhineva analüüsi korral, hübridiseeritakse maatriksile immobiliseeritud geneetilise materjaliga analüüsitav nukleiinhappe lõik, mis on varustatud sellesse amplifikatsioonil sisestatud fluorestsentsmärgistega. Kuna nii moodustuva kaheaahelise nukleiinhappe ahelas asuvate lämmastikaluste vaheliste vesiniksidemete energia on piiratud, siis ei ole selline, ainult hübridisatsioonil põhinev, reaktsioonimehhanism eriti selektiivne ja ei võimalda selget signaali eristamist müra-st.

Teiseks võimaluseks on maatriksile seotud oligonukleotiidide ja analüüsitava nukleiinhappe lõigu hübridisatsioonile lisada ensümaatilise reaktsiooni (näiteks polümeraasi ekstensiooni-

reaktsioon), mille puhul pikendatakse iga matriksile seotud DNA lõiku ühe, fluorestsentsmärgisega varustatud, nukleotiidi võrra ensüümi DNA polümeraasi vastavalt uuritavas DNA-s asuvale geneetilisele informatsioonile.

- 5 Oligonukleotiidmatriksil põhinev DNA ekstensioonireaktsioon DNA polümeraasiga kasutab substraadina fluorofooridega märgitud dideoksünukleotiide. Kuna reaktsioonisegus kasutatakse kõiki nelja fluorofooriga märgitud terminaatornukleotiidi üheaegselt, siis liidetakse immobiliseeritud oligonukleotiidile neljast konkureerivast nukleotiidist vaid üks, uuritava nukleiinhappe primaarstruktuurile vastav nukleotiid.

10

Kasutatav ensümaatiline mehhanism annab ainult hübridisatsioonil põhineva reaktsiooni ees järgmised eelised:

2. Kui matriksile immobiliseeritud DNA ja uuritava nukleiinhappe vaheline hübridisatsioon (paardumine) ei ole perfektne, siis ensüüm antud struktuuri ära ei tunne ja ensümaatiline  
15 reaktsioon ei toimu.

3. Kui hübridisatsioon (paardumine) on perfektne, siis ensüüm liidab immobiliseeritud DNA-le terminaatornukleotiidi, sünteesides nende vahele keemilise sideme, mis on väga püsiv ja võimaldab peale bioloogilise reaktsiooni toimumist matriksit pesta ning sel teel vabaneda mittespetsiifiliselt seondunud bioloogilisest materialist. Sellega on võimalik saavutada  
20 tunduvalt parem signaali ja müra suhe, mis võimaldab antud testsüsteemi kasutada heterosügootsete mutatsioonide detekteerimiseks.

- Käesolevas leiutises avatud meetodit kasutatakse biopolümeermaatriksi analüüsiks, juhtides matriksi aluse (klaasi) otsast sisse kindla lainepikkusega valguskiir (laserikiir) nurga all, mis  
25 kutsub esile selle valguse täieliku sisepeegelduse, nii et matriks muutub valguslaine kandjaks, nagu on kujutatud joonisel fig. 2. Teatav osa valgusest ei peegeldu klaasi sisepinnalt vaid tungib läbi klaasi pinna välja evanestsentse (sumbuva) lainena, mille intensiivsus, küll eksponentsiaalselt langedes, ulatub siiski umbes 1/4-ni valguse lainepikkusest. Antud kaugus klaasi pinnast on küllaldane, et ergastada vahetult matriksi pinnal olevate nukleiinhappe-  
30 molekulide koosseisu lülitatud fluorofoorid. Kuna polümeraasi ekstensiooni puhul on tegemist nelja erineva nukleotiidi/fluorofooriga, siis kasutatakse nende ergastamiseks nelja erineva lainepikkusega laserit, et saavutada fluorestsentsmärgiste maksimaalne ergastus. Emiteeritud valgus kogutakse läbi vastavate emissioonifiltrite, et vabaneda laseri foonvalgusest ja koondatakse optilise süsteemi (objektiivi) abil CCD kaamerasse. Kuna tegemist on jahutatud

CCD kaameral põhineva süsteemiga, siis on taoline fluorestsentssignaalide detekteerimine kiire, vajades ühe nukleotiidi/fluorestsentskanali jaoks 10 sekundit.

#### JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

5

Alljärgnevalt käsitletakse leiutist viidetega joonistele, milles:

- joonis fig. 1 kujutab biopolümeermaatriksi aluse pinnal asuvate fluorokroomide ergastamist läbiva valgusega,
- 10 joonis fig. 2 analoogilise aluse pinnal asuvate fluorokroomide ergastamine valguse täieliku sisepeegelduse abil vastavalt käesoleva leiutise meetodile,
- joonis fig. 3 kujutab käesolevale leiutisele vastavat meetodit kasutavat teostusvarianti, kus laserikiire abil täieliku sisepeegeldusfluorestsentsi saavutamiseks fokuseeritakse kiir silinderläätsel, et selle läbimõõt on väiksem aluse paksusest,
- 15 joonis fig. 4 kujutab käesolevale leiutisele vastavat teostusvarianti, kus laserikiire alusesse juhtimiseks kasutatakse optilist prisma ning prisma ja aluse vahel asuvat läbipaistvat vedelikku, mille murdumisnäitaja on lähedane aluse ja prisma omadele,

20

joonis fig. 5 kujutab leiutisele vastavat fluorestsentsdetektori põhimõtteskeemi.

- Joonised fig. 2 kuni fig. 4 illustreerivad käesolevas leiutises kasutatavat meetodit biopolümeermaatriksite lugemiseks. Õhukesele paralleelsete seintega läbipaistvast materjalist alusele (1) on seotud fluorestseeruvalt märgitud biopolümeerimolekulid. Fluorestseeruvate molekulide ergastamiseks parima efektiivsusega kasutatakse laserikiirt (2). Silinderläätsel (3)
- 25 abil fokuseeritakse laserikiir aluse (1) paksusest väiksema läbimõõduga lehvikuks ning juhitakse alusesse (1) selle otspinna kaudu, kusjuures kiir juhitakse alusesse (1) sellise nurga all, et aluses tekib kiire täielik sisepeegeldumine. Laserikiire abil saavutatud fluorestsents juhitakse optiliselt valgustundlikku elementi, mis võimaldab saada alusele (1) seotud ning laserikiire poolt ergastatud fluorestseeruvate molekulide kujutisi. Eelnevalt kirjeldatud
- 30 mehhanismi abil saavutatud fluorestsents projitseeritakse optiliselt valgustundlikku kaamerasse, mis võimaldab saada alusele (1) seotud ning laserikiire poolt ergastatud fluorestseeruvate molekulide kujutisi, nagu on kujutatud joonisel fig. 5. Laserikiir juhitakse alusesse (1) selle otspinna kaudu. Valgustundliku elemendina kasutatakse digitaalselt juhitud CCD kaamerat (7). Laserikiirt skaneeritakse tasapinnalise läbipaistvast materjalist plaadi või

tahuka abil (4) ning samaaegselt moduleeritakse optilise kiilu (5) abil. Nende elementide koostoimel muutub peegli (6) abil biopolümeermaatriksi alusesse (1) juhitava laserikiire sisenemisnurk.

- 5 Valguskiire juhtimiseks alusesse (1) külgpinnalt kasutatakse prisma (8), nagu on kujutatud joonisel fig. 4. Peegelduskadude vähendamiseks valguse üleminekul prismast (8) alusesse (1) kasutatakse prisma (8) ja aluse (1) vahel läbipaistvat vedelikku (9), näiteks mikroskoopias kasutatavat immersioonõli, mille murdumisnäitaja on lähedane aluse (1) ja prisma (8) murdumisnäitajale.

10

Kuigi leiutist on kirjeldatud seoses sellega, mida praegu peetakse kõige praktilisemaks eelistatud teostuseks, peaks olema mõistetav, et leiutis pole piiratud kirjeldatud teostusega, vaid vastupidi, ta on mõeldud hõlmama mitmesuguseid modifikatsioone ja ekvivalentseid seadmeid, mis sisalduvad juurdelisatud patendinõudluse idees ja ulatuses.

**Patendinõudlus**

1. Meetod biopolümeermaatriksi lugemiseks ja analüüsiks, **mida iseloomustab** see, et maatriksi alusesse juhitakse kindla lainepikkusega valguskiir nurga all nii, et aluses tekitatakse valguse täielik sisepeegeldumine ning maatriks muudetakse valguslaine kandjaks, kusjuures teatav osa valgusest tungib läbi aluse pinna välja evanestsentse lainena, ergastades vahetult maatriksi pinnal olevaid biopolümeerimolekulide koosseisus olevaid fluorofore.
2. Meetod vastavalt punktile 1, **mida iseloomustab** see, et valguskiirena kasutatakse laserikiirt.
3. Fluorestsentsdetektor punktides 1 või 2 toodud meetodi kasutamiseks, mis koosneb digitaalselt juhitud CCD kaamerast (7), selektiivse läbilaskvusega valgusfiltritest ja valgustustustsooni laiendamiseks kasutatavast hajutavast silinderläätselt (3).
4. Fluorestsentsdetektor vastavalt punktile 3, **mida iseloomustab** see, et valgustsooni laiendamine biopolümeermaatriksi aluses saavutatakse laserikiire skaneeriva liikumisega, kusjuures laserikiire skaneerimine on saavutatud tasapinnalise läbipaistvast materjalist plaadi või tahuka (4) abil, mille pööramisel muutub laserikiire sisenemisnurk alusesse (1).
5. Fluorestsentsdetektor vastavalt punktile 3 või 4, **mida iseloomustab** see, et laserikiire aluses (1) ühtlasema jaotumise saavutamiseks kasutatakse moduleerivat elementi.
6. Fluorestsentsdetektor vastavalt punktile 5, **mida iseloomustab** see, et moduleeriva elemendina kasutatakse ümber oma telje pöörlevat optilist kiilu (5), kusjuures optilise kiilu telg asub laserikiire optilise telje lähedal.
7. Fluorestsentsdetektor vastavalt ükskõik millisele punktile 3 kuni 6, **mida iseloomustab** see, et laserikiire alusesse (1) juhtimiseks kasutatava aluse külg- ja/või otspind on töödeldud matiks (valgust hajutavaks) saavutamaks laserikiire ühtlasemat jaotumist aluses.
8. Fluorestsentsdetektor vastavalt ükskõik millisele punktile 3 kuni 7, **mida iseloomustab** see, et laserikiire alusesse (1) juhtimiseks kasutatava aluse külg- ja/või otspind on poleeritud saavutamaks laserikiire suuremat intensiivsust aluses.



9. Fluorestsentsdetektor vastavalt ükskõik millisele punktile 3 kuni 8, mida iseloomustab see, et laserikiire juhtimiseks biopolümeermaatriksi alusesse (1) kasutatakse aluse pinnale kantud difraktsioonvõret.

5 10. Fluorestsentsdetektor vastavalt ükskõik millisele punktile 3 kuni 9, mida iseloomustab see, et laserikiire juhtimiseks biopolümeermaatriksi alusesse (1) läbi aluse külgsinna kasutatakse optilist prisma (8).

11. Fluorestsentsdetektor vastavalt punktile 10, mida iseloomustab see, et aluse (1) ja prisma vahel on läbipaistev vedelik (9), näiteks immersioonõli, mille murdumisnäitaja on lähedane aluse (1) ja prisma (8) murdumisnäitajale.

10

**Kokkuvõte**

Täieliku sisepeegeldusfluorestsentsi kasutamine biopolümeermaatriksi lugemiseks ja analüüsiks kuulub molekulaarbioloogia, molekulaardiagnostika ja laseroptika valdkonda ning on mõeldud fluorestsentsmarkeritega märgistatud biopolümeerimolekulide paralleelseks detekteerimiseks ja analüüsiks kahemõõtmelisel maatriksil. Maatriksil tehtud bioloogilise reaktsiooni tulemuse hindamisel on probleemiks nii detekteerimise madal tundlikkus, selektiivsus ja detekteerimise kiirus. Ülaltoodud probleemide lahendamiseks pakume täieliku sisepeegeldusfluorestsentsi kasutamist kui meetodit ja sisepeegeldusfluorestsentsi kasutamisel põhinevat detektorit kui seadet biopolümeermaatriksi lugemiseks. Analüüsiks kasutame maatriksi alusesse kindla nurga all juhitud valguskiirt, mis kutsub esile selle valguse täieliku sisepeegelduse maatriksi aluses. Teatav osa valgusest ei peegeldu klaasi sisepinnalt vaid tungib läbi klaasi pinna välja evanestsentse lainena ja ergastab vahetult maatriksi pinnal olevate biopolümeerimolekulide koosseisu lülitatud fluorofore. Saavutatud fluorestsents juhatakse valgustundlikku elementi, mis võimaldab saada informatsiooni maatriksi alusele seotud fluorestseeruvatest molekulidest. Taoline fluorestsentssignaalide detekteerimine on kiire, vajades ühe fluorestsentskanali jaoks umbes 10 sekundit.

1/2

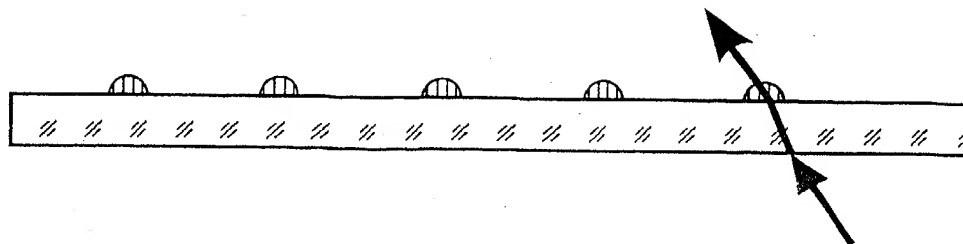


FIG 1

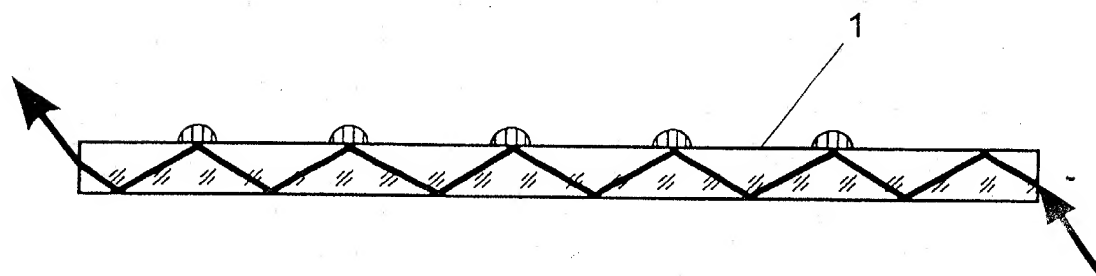


FIG 2

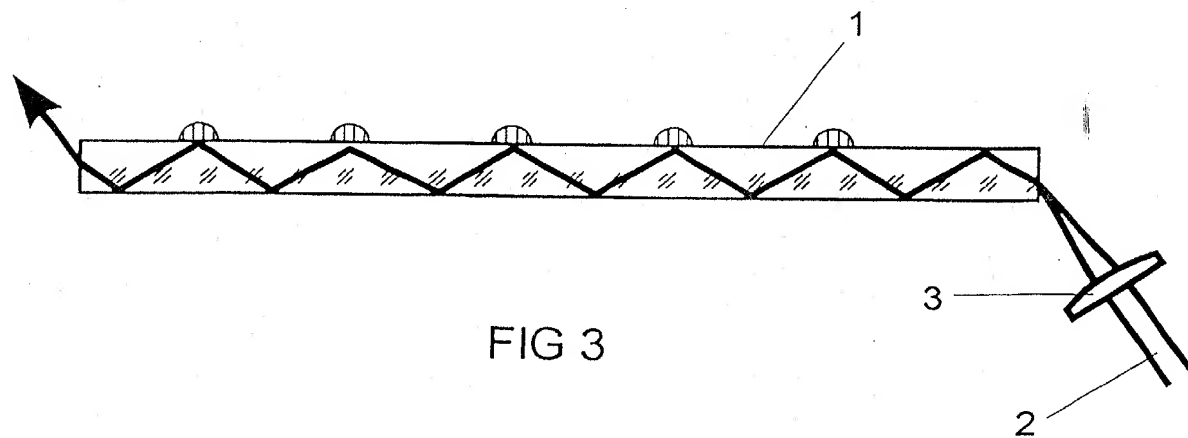


FIG 3

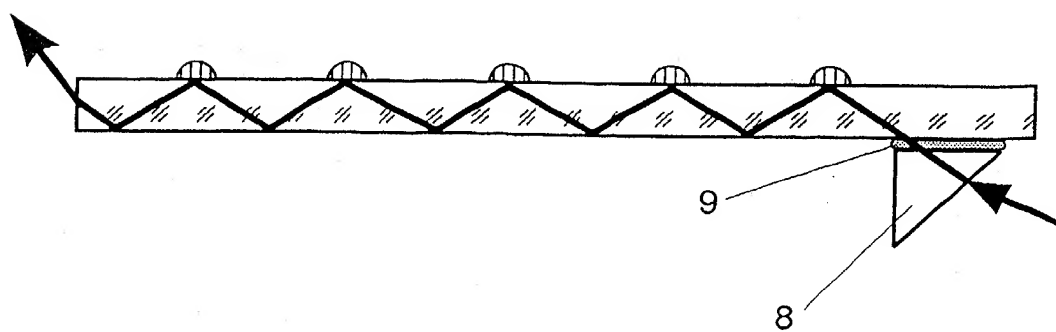


FIG 4

2/2

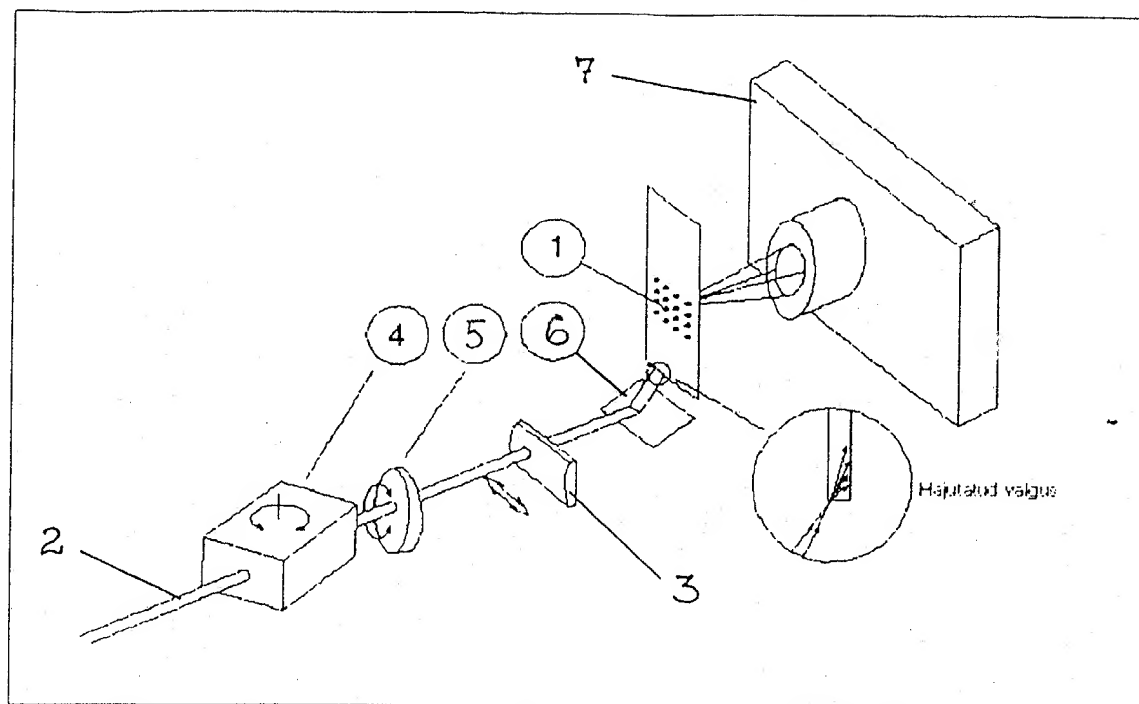


FIG 5